

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022733

引用格式:褚千千,艾健,方佳琪,等.牛血清蛋白与邻苯二酚、间苯三酚相互作用的机理探究[J].食品与发酵工业,2020,46(11):61-68. CHU Qianqian, AI Jian, FANG Jiaqi, et al. Study on the mechanism of interactions between bovine serum albumin with *o*-dihydroxybenzene and *m*-trihydroxybenzene[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(11): 61-68.

牛血清蛋白与邻苯二酚、间苯三酚相互作用的机理探究

褚千千¹, 艾健¹, 方佳琪¹, 韩秋煜¹, 包斌^{1,2*}, 孙永军^{3*}

1(上海海洋大学 食品学院, 上海, 201306) 2(食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海, 201306)

3(好当家集团有限公司, 山东 荣成, 264305)

摘 要 为探究酚类化合物与蛋白质的相互作用机理, 分别用氧化的邻苯二酚 (oxidized *o*-dihydroxybenzene, OOP)、间苯三酚 (oxidized *m*-trihydroxybenzene, OMP) 和未氧化的邻苯二酚 (OP)、间苯三酚 (*m*-trihydroxybenzene, MP) 和牛血清蛋白 (bovine serum protein, BSA) 在常温下反应。分析了 BSA 与 OP、MP、OOP、OMP 反应前后游离氨基、巯基、非共价相互作用力、表面疏水性的变化; 应用傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、圆二色谱 (circular dichroism, CD)、差式扫描量热仪 (differential scanning calorimeter, DSC) 表征构象的变化。结果显示: BSA 与 OP、MP 相互作用后, 游离氨基、巯基含量的变化不显著, 但是 OOP、OMP 可使 BSA 游离氨基、巯基含量显著降低; OP、MP 可与 BSA 形成氢键, 但离子键没有显著变化; OP 与 BSA 反应后, 疏水相互作用显著升高, 而 MP 导致疏水相互作用显著降低; OP、MP、OOP、OMP 都会使 BSA 表面疏水性显著降低; FTIR 和 CD 结果显示, OP、MP、OOP、OMP 都会导致 BSA 二级结构的变化, 表现为 α -螺旋含量降低, β -折叠、 β -转角、无规卷曲含量上升; DSC 结果表明, OP、MP、OOP、OMP 的引入提高了 BSA 的热变性温度。综上, 邻苯二酚、间苯三酚经过氧化后与 BSA 发生共价相互作用, 而未氧化的邻苯二酚、间苯三酚可与 BSA 发生非共价相互作用, 这些相互作用可能改变蛋白质的功能性质, 从而影响蛋白质在食品中的应用。

关键词 邻苯二酚; 间苯三酚; 蛋白质; 共价相互作用; 非共价相互作用

Study on the mechanism of interactions between bovine serum albumin with *o*-dihydroxybenzene and *m*-trihydroxybenzene

CHU Qianqian¹, AI Jian¹, FANG Jiaqi¹, HAN Qiuyu¹, BAO Bin^{1,2*}, SUN Yongjun^{3*}

1(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

2(National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China)

3(Good Master Group Co., Ltd., Rongcheng 264305, China)

ABSTRACT This study aimed to investigate the interaction mechanism between phenolic compounds and proteins. The *o*-dihydroxybenzene (OP) and *m*-trihydroxybenzene (MP) were oxidized under alkaline conditions in the presence of oxygen to obtain oxidized *o*-dihydroxybenzene (OOP) and oxidized *m*-trihydroxybenzene (OMP), which were respectively reacted with oxidized and unoxidized OP, MP and BSA at room temperature. The changes of free amino, sulfhydryl, non-covalent interaction and surface hydrophobicity between BSA and OP, MP, OOP and OMP were analyzed. Changes were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), circular dichroism (CD) and differential scanning calorimeter (DSC). The results showed that the content of free amino and sulfhydryl groups did not change significantly between BSA and OP and MP, but OOP and OMP could significantly reduce the content of free amino and sulfhydryl groups in BSA. And the reduction of OOP-BSA was

第一作者: 硕士研究生(包斌副教授和孙永军高级工程师为共同通讯作者, E-mail: bbao@shou.com; Sun29889@163.com)

收稿日期: 2019-11-06, 改回日期: 2020-01-15

greater than that of OMP-BSA. Moreover, MP can form hydrogen bonds with BSA, but the ionic bond did not change significantly and the increase of MP-BSA hydrogen bond was greater than that of OP-BSA. After the reaction between OP and BSA, the hydrophobic interaction increased significantly. While MP caused the hydrophobic interaction to decrease significantly. Furthermore, OP, MP, OOP, OMP could significantly reduce the hydrophobicity of BSA surface and the reduction of OP-BSA, OOP-BSA was greater than MP-BSA, OMP-BSA. FTIR and CD results showed that OP, MP, OOP, OMP could change the secondary structure of BSA which was characterized by the decreased α -helix content and increased β -sheet, β -turn and random coil. The effects of OP and OOP were greater than those of MP and OMP. DSC results showed that the introduction of OP, MP, OOP and OMP increased the thermal denaturation temperature of BSA. These results indicated that catechol and phloroglucinol undergo oxidative interaction with BSA and unoxidized catechol and phloroglucinol could interact non-covalently with bovine serum albumin. These interactions may alter the functional properties of the protein, thereby affecting the application of the protein in food.

Key words *o*-dihydroxybenzene; *m*-trihydroxybenzene; protein; covalent interaction; non-covalent interaction

蛋白质不仅为人类提供了必需的营养物质,并且在食品加工中具有胶凝、乳化、起泡、水结合等多种功能性质^[1-3]。一些蛋白质由于受固有结构的限制,导致其功能性质缺乏,或者由于环境条件变化、食品加工处理,功能性质也会受到负面影响^[4-6]。为了改善蛋白质的功能性质,可以在含蛋白质食品中添加一些外源性成分,以更好地满足加工业的需求,例如酚类化合物、淀粉、非肌肉蛋白、转谷氨酰胺酶等^[7-9]。酚类化合物由于具有抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤等多种生物活性^[9-10],而被应用于食品、药品中。一些学者研究发现植物多酚提取物可以作为鱼糜凝胶的增强剂^[10-13],改善鱼糜制品的口感和质地。PRIGENT等^[14]发现原花青素可以改善球蛋白(牛血清蛋白、溶菌酶、 α -乳白蛋白)的泡沫稳定性。ALU'DATT等^[15]研究发现,从亚麻籽蛋白质分离物中去除游离和结合的酚类化合物降低了亚麻籽蛋白的热稳定性、持水性和黏弹性。

近年来关于酚类化合物与蛋白质相互作用的机理逐渐成为研究热点,有学者探究了氧化的单宁酸、阿魏酸、绿原酸、没食子酸等与蛋白质的共价结合^[16-18],推测这些酚类化合物被氧化后可以形成相应的醌类物质,氨基酸侧链和醌之间的反应可能导致蛋白质分子聚合,从而形成复合物,进而影响蛋白质功能性质^[19]。也有学者提出酚类化合物也可以与蛋白质发生非共价相互作用^[20-21],徐洁琼等^[22]探究了热加工处理对 β -乳球蛋白与酚酸(绿原酸、咖啡酸、阿魏酸)间相互作用的影响。

前期有研究表明,褐藻多酚提取物能够提高鱼糜凝胶的破断力和凝胶强度^[23],说明褐藻多酚和鱼糜蛋白质发生了反应。褐藻多酚是间苯三酚的脱氢聚合物,有时带有额外的卤素或羟基^[24]。为了进一步研究褐藻多酚与蛋白质之间的反应机理,本文选择其单体酚——间苯三酚(*m*-trihydroxybenzene, MP)作为研究对象,同时选择与间苯三酚结构相近的邻苯二酚(*o*-dihydroxybenzene, OP)作为比较。RAWEL等^[25]提出,牛血清蛋白(bovine serum protein, BSA)由于具有较高的分子量,并且可以与酚类化合物形成可溶性复合物,适合用于这类机理的研究。因而本文先将OP、MP进行氧化,将氧化和未氧化的OP、MP与BSA进行反应,从共价相互作用和非共价相互作用2个角度比较研究BSA与邻苯二酚、间苯三酚相互作用的机理,以期对酚类化合物在开发健康和营养食品中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

BSA(优级纯),上海美伦生物科技有限公司;OP、MP,均为优级纯,国药集团化学试剂有限公司;三硝基苯磺酸(trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS),美国Sigma公司;*L*-亮氨酸、NaCl、尿素、溴化钾、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(Gly)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 NaHSO_3 ,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;2-硝基苯甲酸、8-苯胺-1-萘

磺酸(ANS),分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司。

UV1102 紫外分光光度计,上海谱元仪器有限公司; Synergy2 多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;96 孔酶标板,上海康宁有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,深圳市超杰生物科技有限公司;真空冷冻干燥机、NICOLET iS5 傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR),美国 Thermo 公司;高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;Chirascan 圆二色谱(circular dichroism, CD),英国 Leatherhead 公司;差示扫描量热仪(differential scanning calorimeter, DSC),美国 TA 仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 酚类化合物-蛋白质复合物的制备

参考 RAWEL 等^[26]的方法制备酚类化合物-蛋白质复合物,略有改动。

氧化邻苯二酚-牛血清蛋白(OOP-BSA)、氧化间苯三酚-牛血清蛋白(OMP-BSA)复合物的制备:将 10 g/L 的邻苯二酚、间苯三酚水溶液用 NaOH 调 pH 为 9,暴露于空气中在 25 ℃ 的条件下连续搅拌氧化 24 h。分别取 2 mL 氧化的邻苯二酚、间苯三酚水溶液加入到 20 mL 1 mg/mL 的 BSA 水溶液中,反应 2 h。

邻苯二酚-牛血清蛋白(OP-BSA)、间苯三酚-牛血清蛋白(MP-BSA)复合物的制备:分别取 2 mL 10 g/L 的邻苯二酚、间苯三酚水溶液加入到 20 mL 1 mg/mL 的 BSA 水溶液中,加入液体石蜡液封以隔绝氧气,反应 2 h。

对照组:取 2 mL 超纯水加入到 20 mL 1 mg/mL 的 BSA 水溶液中。

将上述反应后的复合物及对照组透析 24 h,每隔 4 h 换一次水,以除去未反应的酚类化合物。取一部分透析液进行真空冷冻干燥,备用。剩下的透析液用做液体样品。

1.2.2 游离氨基含量的测定

参照 CROWELL^[27]采用 TNBS 的方法测定样品中游离氨基含量的变化,略有改动。取待测溶液 125 μ L,加入 1 mL pH 8.2 的磷酸缓冲溶液及 1 mL 1 g/L TNBS,将混合好的样品置于 50 ℃ 的暗处摇匀 1 h。将样品取出后加入 2 mL 0.1 mol/L 的 NaHSO₃,至于暗处,30 min 后于 420 nm 下测吸光值。以 0.1 ~ 0.5 mmol/L 浓度的 L-亮氨酸作标准曲线来定量游离氨基含量。

1.2.3 巯基含量的测定

参照 BEVERIDGE 等^[28]的方法,准确称取 0.4 g DTNB 于 100 mL Tirs-Gly 缓冲溶液(每升溶液含 10.4 g Tirs,6.9 g Gly,1.2 g EDTA,pH 8)中,配制成 4 mg/mL 的 Ellman's 试剂。取 0.5 mL 样品加入 2 mL 8 mol/L 尿素(溶于 Tirs-Gly 缓冲溶液)及 40 μ L Ellman's 试剂,在室温下放置 1 h 后于 412 nm 处测吸光度,巯基的计算如公式(1)所示:

$$S = \frac{73.53 A_{412} \times D}{\rho} \quad (1)$$

式中:S,巯基含量, μ mol/g;73.53 来自 $10^6/(1.36 \times 10^4)$, 10^6 表示从摩尔基础到 μ mol/mL 基础以及从 mg 固体到 g 固体的转化率, 1.36×10^4 是摩尔吸光系数, $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$;D,稀释倍数; ρ ,蛋白质量浓度,mg/mL。

1.2.4 OP、MP 与 BSA 非共价相互作用力的测定

参考 GÓMEZ-GUILLÉN 等^[29]的方法,略有改动。取 1 mL 样品分别溶于 5 mL A、B、C、D 4 种溶液中。A 为 0.05 mol/L NaCl、B 为 0.6 mol/L NaCl、C 为 0.6 mol/L NaCl + 1.5 mol/L 尿素、D 为 0.6 mol/L NaCl + 8 mol/L 尿素。混匀后于 4 ℃ 静置 1 h,然后 10 000 r/min 离心 15 min,用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质的含量。

离子键的含量以溶解于 A、B 溶液中蛋白质含量之差来表示;氢键以溶解于 B、C 溶液中蛋白质的含量之差来表示;疏水性相互作用以溶解于 C、D 溶液中蛋白质的含量之差来表示。

1.2.5 表面疏水性的测定

参照文献[30]的方法,略有改动。以 ANS 试剂为荧光探针,将样品用磷酸缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.0)稀释为 5 个蛋白终浓度(0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL)。取 2 mL 上述稀释液加入 40 μ L 8 mmol/L ANS 溶液,室温下放置 15 min。用 Synergy 2 多功能酶标仪在激发光波长 360 nm、发射光波长 460 nm 下测定样品的荧光强度。同时,分别以相同浓度的邻苯二酚、间苯三酚溶液作为试剂空白。最后,以荧光强度对 BSA 浓度作图进行线性分析,所得曲线斜率即为该样品的蛋白质表面疏水性。

1.2.6 酚类化合物-蛋白质复合物构象的表征

1.2.6.1 傅里叶变换红外光谱分析

采用溴化钾压片法进行 FTIR 分析。分别取冻干后的对照组样品和复合物 1 mg 加入适量的 KBr,用玛瑙研钵研磨成均匀细粉状,压片。扫描条件:波数范围 4 000 ~ 650 cm^{-1} ,次数 16 次,分辨率为 4 cm^{-1} 。采用 KBr 做空白对照,每个样品在相同条件

下重复 3 次取平均值。

使用 OMNIC 9 软件,对样品谱图进行修整校正。剪切蛋白质酰胺 I 带 ($1\,600\sim1\,700\text{ cm}^{-1}$) 的数据在 Peakfit 4.12 软件中进行基线校正,去卷积,采用 Gausse 函数进行二阶导数拟合,直至拟合相关系数 $R^2\geq 0.99$,且稳定不再变化,确定各子峰与各二级结构的对应关系,计算各子峰面积的相对百分含量。

1.2.6.2 圆二色谱分析

通过圆二色谱仪对酚类化合物-蛋白质复合物中蛋白质的二级结构进行分析。测定在室温且持续通氮气的条件下进行,扫描速度 100 nm/min ,带宽 1.0 nm ,路径长度 0.5 mm 。将样品浓度稀释到 0.1 mg/mL ,在 $190\sim260\text{ nm}$ 范围内进行测定,平均测定 3 次。

1.2.6.3 变性温度分析

采用差式扫描量热法,参考曹艳芸^[31]的方法,称取 5 mg 左右冻干的对照组样品和复合物,置于铝制坩埚中。加热温度范围为 $20\sim120\text{ }^{\circ}\text{C}$,升温速率为 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 。空样品坩埚作为空白对照。用 Universal analysis 分析软件(TA 公司)计算样品在升温过程中的最大转变温度。

1.2.7 统计与分析

本文实验所有样品均为 3 组平行。作图采用 OriginPro 9.1 软件,采用 SPSS statistic 22.0 进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 邻苯二酚和间苯三酚对 BSA 游离氨基和巯基的影响

BSA 与酚类化合物反应前后游离氨基和巯基含量如表 1 所示。与对照相比,OOP-BSA、OMP-BSA 复合物中游离氨基和巯基的含量均显著降低($P<0.05$),并且 OOP-BSA 的降低量大于 OMP-BSA。说明氧化的邻苯二酚、间苯三酚与牛血清蛋白的游离氨基、巯基发生共价反应,而且该反应与酚羟基的反应活性有关。OP 由于其羟基取代的高反应性,很容易被氧化,在 O_2 存在的碱性条件下即可进行自动氧化^[32]。OP 被氧化成相应的邻苯二醌,醌是一种反应性亲电子中间体,可能会和 BSA 氨基酸侧链中的游离氨基、巯基发生反应,形成 C—N 或 C—S 共价键。氨基酸侧链和醌之间的反应会导致蛋白质分子的聚合,从而形成复合物^[33]。但是对于间苯三酚来说,MP 不能被氧化成相应的醌,而是形成了半醌自由基^[34],半醌自由基可以攻击亲核反应配偶体,从而和

BSA 的游离氨基、巯基反应,形成复合物。半醌自由基的反应活性低于醌,因而导致 OOP-BSA 复合物游离氨基和巯基较 BSA 的降低量大于 OMP-BSA 复合物。RAWEL 等^[35]比较了邻苯二酚、间苯二酚与溶菌酶的共价反应活性,结果显示邻苯二酚的反应活性更高。对于未氧化的邻苯二酚和间苯三酚而言,OP-BSA、MP-BSA 复合物中游离氨基和巯基的含量较对照均没有显著性变化($P<0.05$),进一步说明了酚类化合物只有在被氧化形成醌或半醌自由基后才能与蛋白质发生共价反应。

表 1 BSA 及其复合物的游离氨基与巯基含量($n=3$)
Table 1 Free amino and sulfhydryl content of BSA and its complexes

| 样品 | 游离氨基浓度/ ($\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$) | 巯基浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|---------|--|--|
| 对照(BSA) | 0.71 ± 0.04^a | 48.30 ± 2.00^a |
| OOP-BSA | 0.36 ± 0.03^b | 31.00 ± 1.50^b |
| OP-BSA | 0.70 ± 0.02^a | 46.80 ± 1.80^a |
| OMP-BSA | 0.48 ± 0.04^c | 40.80 ± 1.90^c |
| MP-BSA | 0.68 ± 0.03^a | 46.50 ± 2.10^a |

注:数据取 $\bar{x}\pm\text{SD}$,不同字母表示显著性差异($P<0.05$)

2.2 邻苯二酚、间苯三酚与 BSA 之间的非共价相互作用力分析

KANG 等^[36]提出绿原酸和阿魏酸与人血清蛋白的非共价相互作用主要包括芳香环与疏水氨基酸残基之间的疏水力,羧酸盐基团与碱性氨基酸残基之间的静电力以及羟基与多肽链之间的氢键。鉴于未氧化的 OP、MP 不能和 BSA 发生共价相互作用,因而对 OP、MP 和 BSA 之间的非共价相互作用进行探究(图 1)。酚类化合物和蛋白质之间的非共价相互作用包括 5 种类型:氢键,疏水相互作用,静电相互作用,范德华力和离子键^[37]。其中氢键和疏水相互作用被认为是酚类化合物和蛋白质之间相互作用的主要驱动力^[38]。从图 1 可见,和对照相比,OP-BSA、MP-BSA 离子键没有显著变化($P<0.05$),说明 OP、MP 未与 BSA 形成新的离子键。氢键含量显著升高($P<0.05$),并且 MP-BSA 的增加量大于 OP-BSA。因为酚基团是一种优良的氢供体,很容易与蛋白质的羧基形成氢键,从而导致 OP-BSA、MP-BSA 复合物中氢键含量升高,并且间苯三酚的羟基数量大于邻苯二酚,因而与 BSA 形成更多的氢键。OP-BSA 的疏水相互作用较对照显著提高($P<0.05$),而 MP-BSA 的疏水相互作用显著下降。酚类化合物中的芳基和 BSA 分子内部的疏水性基团发生聚集,降低了其结合水的能力,疏水相互作用增强^[39],而 MP 由于含有较多的羟

基,羟基是一种亲水性基团,羟基的亲水性可能会阻碍芳基和 BSA 疏水性基团的聚集,也可能是氢键成为了 MP 和 BSA 之间相互作用的主要驱动力,因而导致 MP-BSA 中疏水相互作用降低。

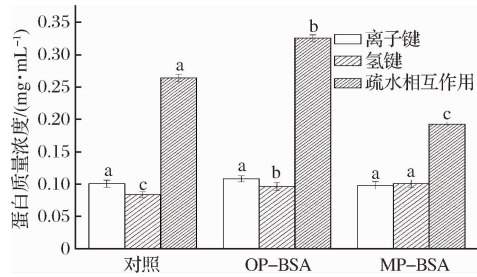


图1 邻苯二酚、间苯三酚与 BSA 的非共价相互作用
Fig.1 Effect of OP and MP on the interaction force of BSA
注:上标不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$) (下同)

2.3 邻苯二酚、间苯三酚对 BSA 表面疏水性的影响

蛋白质的表面疏水性变化可以反映蛋白质与水、其他化学物质产生作用时的实际情况^[40]。氧化与未氧化的邻苯二酚、间苯三酚对 BSA 表面疏水性的影响如图 2 所示,与对照相比,OP、MP、OOP、OMP 的引入都会使 BSA 的表面疏水性显著降低 ($P < 0.05$),这说明酚类化合物与 BSA 的疏水性氨基酸发生了反应。RAWEL 等^[41]讨论了氧化邻苯二酚在色氨酸的杂环 N-原子上发生反应的可能性,证实了酚类化合物被氧化成醌后和蛋白质色氨酸发生了共价反应,导致蛋白质表面疏水性降低。而未氧化的酚类化合物的氢原子也很容易和色氨酸的氮原子形成分子间氢键,发生非共价相互作用。图 2 显示 OOP-BSA、OMP-BSA 复合物的表面疏水性显著低于 OP-BSA、MP-BSA 复合物,说明相较非共价反应,蛋白质如果与酚类化合物发生共价反应,会对蛋白质的表面疏水性产生更大的影响。另一方面,OP-BSA、OOP-BSA 复合物表面疏水性显著低于 MP-BSA、OMP-BSA 复合物,说明邻苯二酚对蛋白质表面疏水性的影响大于间苯三酚。

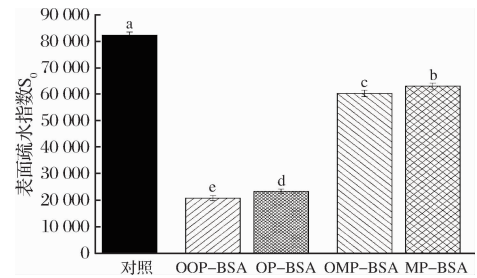


图2 邻苯二酚、间苯三酚对 BSA 表面疏水性的影响
Fig.2 Effect of OP and MP on the surface hydrophobicity of BSA

2.4 邻苯二酚、间苯三酚对 BSA 二级结构的影响

2.4.1 傅里叶变换红外光谱分析

为了确定邻苯二酚、间苯三酚对 BSA 构象的影响,本研究分析了 OOP-BSA、OMP-BSA、OP-BSA、MP-BSA 复合物 FTIR 光谱的变化,如图 3 所示。BSA 的特征峰表现为 $1\ 651\text{ cm}^{-1}$ (酰胺 I 带,主要是 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩)、 $1\ 536\text{ cm}^{-1}$ (酰胺 II 带,主要是 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩和 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲模式)、 $3\ 303\text{ cm}^{-1}$ (酰胺 A 带,主要是 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩和氢键)^[42]。与对照相比,在酰胺 A 带 OOP-BSA、OP-BSA、MP-BSA 发生了蓝移,OMP-BSA 发生了红移,说明蛋白质的 $-\text{NH}_2$ 参与了反应。

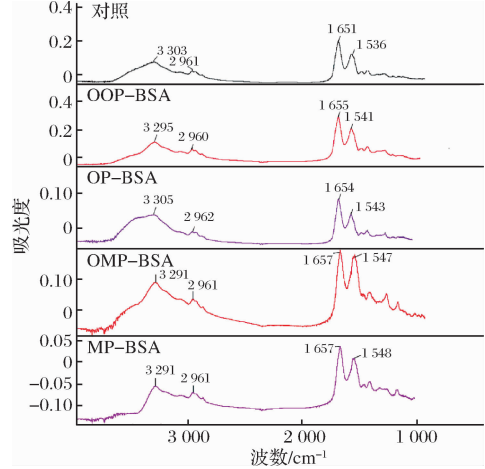


图3 邻苯二酚、间苯三酚与 BSA 相互作用的红外光谱图
Fig.3 Infrared spectrum of interaction between OP, MP and BSA

与 BSA 比较,4 种复合物在酰胺 I 和酰胺 II 带也发生了位移,说明 BSA 与邻苯二酚、间苯三酚的相互作用伴随着蛋白质二级结构的变化。对酰胺 I ($1\ 600 \sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$) 的光谱进行高斯拟合,得到二级结构含量,如表 2 所示。OP-BSA、OOP-BSA、MP-BSA、OMP-BSA 复合物中 α -螺旋含量分别降低 15.40%、15.60%、16.00%、16.00%, β -折叠分别上升 25.60%、28.90%、18.20%、14.00%, β -转角分别上升 7.10%、5.90%、7.70%、17.20%,无规则卷曲分别上升 5.10%、5.60%、1.20%、3.40%。表明引入氧化和未氧化的 OP、MP 都会破坏 BSA 的二级结构,并且 OP、OOP 对 BSA 二级结构的影响大于 MP、OMP,这与邻苯二酚对 BSA 一级结构有更大影响相对应。蛋白质中的 α -螺旋、 β -折叠结构是靠氢键来稳定的,酚类化合物的加入造成蛋白分子内部的氢键发生改变,从而导致 BSA 二级结构的变化。RAWEL 等^[25]在探究绿原酸共价结合诱导牛血清白蛋白的结

构变化时发现,绿原酸和 BSA 的反应导致 BSA α -螺旋减少,而其余结构增加。JIANG 等^[43]在研究乳清蛋白分离物(whey protein isolates, WPI)和酪蛋白(casein, CS)与绿原酸非共价相互结合时,发现 WPI/CS 红外光谱图中酰胺 I 和酰胺 II 的移动,并且 α -螺旋含量减少, β -折叠含量增加。这些结果与本研究结果一致。

表 2 基于 FTIR 的 BSA 及其复合物二级结构分析

单位: %

Table 2 Secondary structure analysis of BSA and its complex based on FTIR

| 二级结构 | BSA | OOP-BSA | OP-BSA | OMP-BSA | MP-BSA |
|--------------|-------|---------|--------|---------|--------|
| α -螺旋 | 50.00 | 42.20 | 42.30 | 42.00 | 42.00 |
| β -折叠 | 12.10 | 15.60 | 15.20 | 13.80 | 14.30 |
| β -转角 | 22.10 | 23.40 | 23.80 | 25.90 | 23.80 |
| 无规则卷曲 | 17.80 | 18.80 | 18.70 | 18.40 | 18.00 |

2.4.2 圆二色谱分析

圆二色谱是研究蛋白质构象的一种常用方法,在近紫外区,蛋白质的圆二色性主要由侧链基团所贡献,主要用来分析蛋白质二级结构的变化。酚类化合物与 BSA 结合前后的结构变化如图 4 所示。BSA 处于天然状态时圆二色谱线在 190 nm 左右为正峰,205 ~ 235 nm 时为负槽。在 209 和 222 nm 左右呈现出 2 个负槽,称为双负槽曲线,代表 BSA 的 α -螺旋结构;在 215 nm 左右的负槽代表 β -折叠结构。当 BSA 与酚类化合物反应后,CD 峰强度发生改变,图谱出现轻微的蓝移现象,表明氧化与未氧化的 OP、MP 与 BSA 的反应改变了蛋白质的二级结构。

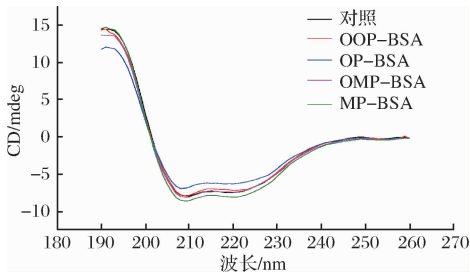


图 4 邻苯二酚、间苯三酚与 BSA 相互作用的近紫外圆二色谱图

Fig. 4 Near-UV circular dichroism of interaction between OP, MP and BSA

采用 Dichroweb 程序对 BSA 及 BSA 复合物的二级结构的百分含量进行了估算,结果如表 3 所示,CD 结果与红外结果一致。与 BSA 相比,4 种 BSA 复合物的 α -螺旋含量降低,而其余结构增加。CD 结果在

数值上与 FTIR 的结果存在一些差异,这可能由于样品不同所致,红外光谱测定的样品为冻干样,而远紫外 CD 色谱测定的样品为水溶液。

表 3 基于 CD 的 BSA 及其复合物二级结构分析

单位: %

Table 3 Secondary structure analysis of BSA and its complexes based on CD

| 二级结构 | BSA | OOP-BSA | OP-BSA | OMP-BSA | MP-BSA |
|--------------|-------|---------|--------|---------|--------|
| α -螺旋 | 55.30 | 51.20 | 47.60 | 47.60 | 42.80 |
| β -折叠 | 7.30 | 8.00 | 9.00 | 8.60 | 9.80 |
| β -转角 | 12.80 | 13.40 | 14.20 | 14.50 | 15.50 |
| 无规则卷曲 | 21.60 | 25.30 | 26.80 | 27.40 | 30.20 |

2.5 邻苯二酚、间苯三酚对 BSA 变性温度的影响

DSC 是测定蛋白质变性温度的一种常用手段,进而反映出蛋白质构象的变化。MOSTAFA 等^[44]在研究咖啡酸和乳清蛋白相互作用时发现,绿原酸在碱性条件下修饰乳清蛋白会提高蛋白的热稳定性。本文所研究的 BSA 变性温度为 86 $^{\circ}\text{C}$,如图 5 所示,与酚类化合物反应后,OOP-BSA、OP-BSA、OMP-BSA、MP-BSA 的 T_{max} 分别为 90、89、87、90 $^{\circ}\text{C}$,均有所升高。

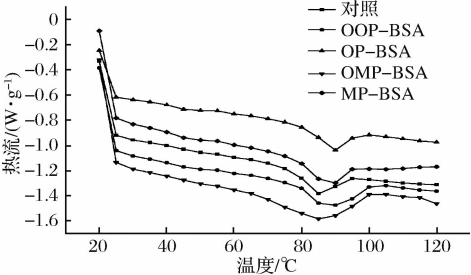


图 5 BSA 及其复合物的差式扫描图

Fig. 5 Differential scan of BSA and its complexes

热变性温度与蛋白质的二级结构密切相关,蛋白质二级结构的 β -折叠比 α -螺旋的疏水性更强,因此 β -折叠含量更高的蛋白质的热变性温度更高^[37]。因此当邻苯二酚、间苯三酚与蛋白质相互作用使 β -折叠增加时,会导致变性温度升高。根据 FTIR 分析结果,OMP-BSA 复合物 β -折叠含量增加幅度最低,因此其变性温度的变化幅度最小。并且 OP、MP 的引入使 BSA 无规则卷曲含量升高,说明 BSA 的有序相结构含量减少,无序结构增加,这也可能导致 BSA 变性温度升高^[44]。

3 结论

邻苯二酚、间苯三酚与 BSA 既能发生共价相互作用也能发生非共价相互作用。共价相互作用是蛋

白质氨基酸侧链和醌之间的反应,非共价相互作用主要是氢键和疏水相互作用,导致 BSA 表面疏水性降低。这些反应使 BSA 的构象发生显著变化,主要是二级结构改变(α -螺旋含量降低, β -折叠、 β -转角和无规则卷曲含量增加)、热变性温度升高。这些结果对于进一步研究褐藻多酚与蛋白质相互作用的机理提供了依据。

参 考 文 献

- [1] ZIEGLER V, FERREIRA C D, HOFFMANN J F, et al. Effects of moisture and temperature during grain storage on the functional properties and isoflavone profile of soy protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2018, 242: 37–44.
- [2] DE CASTRO R J S, DOMINGUES M A F, OHARA A, et al. Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications[J]. Food Structure, 2017, 14: 17–29.
- [3] 魏倩,张莹莹,阎欣,等. 豆类蛋白和谷物蛋白的功能性对比[J]. 粮食加工, 2018, 43(1): 36–41.
- [4] 王盼盼. 食品中蛋白质的功能(三) 食品中蛋白质的功能特性[J]. 肉类研究, 2009(6): 71–77.
- [5] BOWKER B C, GRANT A L, SWARTZ D R. Myosin heavy chain isoforms influence myofibrillar ATPase activity under simulated post-mortem pH, calcium, and temperature conditions[J]. Meat Science, 2004, 67(1): 139–147.
- [6] AROGUNDADE L A. Functional characterization of Tef (Eragrostis tef) protein concentrate: Influence of altered chemical environment on its gelation, foaming, and water hydration properties[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(6): 831–838.
- [7] SUN Fengyuan, HUANG Qilin, HU Ting, et al. Effects and mechanism of modified starches on the gel properties of myofibrillar protein from grass carp[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 17–24.
- [8] SUN Lijun, SUN Jiaojiao, PRIDHUVI THAVARAJ, et al. Effects of thinned young apple polyphenols on the quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi during cold storage[J]. Food Chemistry, 2017, 224: 372–381.
- [9] RAWDKUENA S, BENJAKUL S. Whey protein concentrate: Autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 1 077–1 084.
- [10] SUN L, SUN J, PRIDHUVI T, et al. Effects of thinned young apple polyphenols on the quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi during cold storage[J]. Food Chemistry, 2017, 224: 372–381.
- [11] MARÍN D, ALEMÁN A, SÁNCHEZ-FAURE A, et al. Freeze-dried phosphatidylcholine liposomes encapsulating various antioxidant extracts from natural waste as functional ingredients in surimi gels[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 525–535.
- [12] BUAMARD N, BENJAKUL S. Improvement of gel properties of sardine (*Sardinella albella*) surimi using coconut husk extracts[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 51: 146–155.
- [13] VON STASZEWSKI M, JAGUS R J, PILOSOFF A M R, et al. Pilosof. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1 077–1 084.
- [14] PRIGENT S V E, VORAGEN A G J, VAN KONINGSVELD G A. Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(12): 5 844–5 853.
- [15] ALUDATT M H, RABABAH T, ALLI I. Effect of phenolic compound removal on rheological, thermal and physico-chemical properties of soybean and flaxseed proteins[J]. Food Chemistry, 2014, 146: 608–613.
- [16] BALANCE A K, BENJAKUL S. Cross-linking activity of oxidised tannic acid towards mackerel muscle proteins as affected by protein types and setting temperatures[J]. Food Chemistry, 2010, 120: 268–277.
- [17] KROLL J, RAWEL H M. Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenolic compounds[J]. Food Chemistry and Toxicology, 2001, 66(1): 48–57.
- [18] CAO Y, XIONG Y. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 235–243.
- [19] KROLL J, RAWEL H M, ROHN S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds[J]. Food Sci. Technol. Res, 2003, 9(3): 205–218.
- [20] OJHA H, MISHRA K, I. HASSAN M, et al. Spectroscopic and isothermal titration calorimetry studies of binding interaction of ferulic acid with bovine serum albumin[J]. Thermochimica Acta, 2012(548): 56–64.
- [21] NAGY K, COMPOUNDU M C C, WILLIAMSON G. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence[J]. Food Chemistry, 2012, 132: 1 333–1 339.
- [22] 徐洁琼,曾茂茂,秦昉,等. 热加工处理对 β -乳球蛋白与茶多酚间相互作用的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(8): 96–102.
- [23] 王育信. 褐藻多酚的提取和鉴定及其对鱼糜凝胶物性的影响[D]. 上海:上海海洋大学,2018.
- [24] CONNAN S, GOULARD F, STIGER V, et al. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae[J]. Botanica Mar, 2004, 47: 410–416.
- [25] RAWEL H M, KROLL J, HOHL U C. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins[J]. Molecular Nutrition, 2001, 45(2): 72–81.
- [26] RAWEL H M, ROHN S, KRUSE H P, et al. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 443–455.
- [27] CROWELL E A. Determination of alpha amino nitrogen in musts and wines by TNBS method[J]. Journal of Enology and Viticulture, 1985, 36(2): 175–177.
- [28] BEVERIDGE T, TOMA S J, NAKAI S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal of Food Science, 1974, 39: 49–51.
- [29] GÓMEZ-GUILLÉN M C, BORDERÍAS A J, MONTERO P. Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of sardine (*Sardine pilchardus*) muscle gels[J]. Lebensmittel-wissenschaft Und-technologie-food Science and Technology, 1997, 30(6): 602–608.
- [30] ALIZADEH-PASDAR N, LI-CHAN E C. Comparison of protein

- surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 328–334.
- [31] 曹艳芸. 乳清蛋白与多酚在中性 pH 条件下的相互作用对蛋白功能性质的影响研究[D]. 无锡:江南大学, 2017.
- [32] TANAKA T, KOUNO I. Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism[J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(2): 128–133.
- [33] KROLL J, RAWEL H M, ROHN S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds[J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(3): 205–218.
- [34] RAWEL H M, KROLL U J, HOHL C. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins[J]. *Molecular Nutrition*, 2001, 45(2): 72–81.
- [35] RAWEL H M, KROLL J, ROHN S. Reactions of phenolic substances with lysozyme—physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives[J]. *Food Chemistry*, 2001(72): 59–71.
- [36] KANG J, LIU Y, XIE M. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid[J]. *Food Chemistry*, 2017, 236: 114–118.
- [37] CHU Q, BAO B, WU W. Mechanism of interaction between phenolic compounds and proteins based on non-covalent and covalent interactions[J]. *Medicine Research*, 2018, 2: 1–6.
- [38] 赵新淮, 徐红华, 姜毓敏. 食品蛋白质-结构、性质与功能[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 207.
- [39] OJHA H, MISHRA K, HASSAN M I, et al. Spectroscopic and isothermal titration calorimetry studies of binding interaction of ferulic acid with bovine serum albumin[J]. *Thermochimica Acta*, 2012, 548: 56–64.
- [40] 齐宝坤, 赵城彬, 江连洲, 等. 大豆分离蛋白组成及二级结构对表面疏水性的影响[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(5): 288–293.
- [41] RAWEL H M, KROLL J, RIESE B. Reactions of chlorogenic acid with lysozyme: physicochemical characterization and proteolytic digestion of the derivatives[J]. *Sensory and Nutritive Qualities of Food*, 2000, 65(6): 1 091–1 097.
- [42] GÜLER, VOROB'EV M M, VOGEL V, et al. Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 161: 8–18.
- [43] JIANG J, ZHANG Z, ZHAO J, et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of in vitro protein digests[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 334–341.
- [44] ALI M, HOMANN T, KHALIL M, et al. Milk whey protein modification by coffee-specific phenolics: Effect on structural and functional properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(28): 6 911–6 920.
- [45] KIM S J, USTUNOL Z. Thermal properties, heat sealability and seal attributes of whey protein isolate/lipid emulsion edible films[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(7): 985–990.